

**UNIVERSIDADE DE LISBOA**

**FACULDADE DE FARMÁCIA**

**MESTRADO EM CONTROLO DA QUALIDADE E TOXICOLOGIA DOS ALIMENTOS**

**ESTUDOS DE MIGRAÇÃO DO BISFENOL A EM BIBERÕES**

**DISSERTAÇÃO ORIENTADA POR:**

**PROF<sup>a</sup> ANA PAULA MARREILHA DOS SANTOS**

**PROF<sup>a</sup> MARIA LUÍSA ANDRADE MATEUS**

**INÊS PÁRAMOS MERINO FARIA ENCARNÇÃO**

**LISBOA**

**2007**

Dissertação de candidatura ao grau  
de mestre em Controlo de Qualidade  
e Toxicologia dos Alimentos  
apresentada à Faculdade de  
Farmácia da Universidade de Lisboa.

Este trabalho foi realizado no  
Laboratório de Toxicologia e de  
Métodos Instrumentais de Análise da  
Faculdade de Farmácia da  
Universidade de Lisboa.

## RESUMO

O bisfenol A é um composto com reconhecidas propriedades estrogénicas, cujos efeitos se fazem sentir sobretudo ao nível da fertilidade, desenvolvimento e comportamento. Estudos recentes revelam que este composto tem capacidade para exercer os seus efeitos mesmo em concentrações inferiores à actual TDI.

Actualmente a principal aplicação do bisfenol A é como matéria prima no fabrico do plástico policarbonato (PC). Este polímero está aprovado para o fabrico de recipientes que contactam com os alimentos, nomeadamente biberões.

A União Europeia (UE) impõe um limite de migração específica para o bisfenol A de 3 mg/L; este limite será reduzido para 0,6 mg/L a partir de Dezembro de 2007. Contudo, quando se refere a recipientes destinados à alimentação de crianças o limite é de 0,3 mg/L. A UE estabeleceu recentemente uma TDI de 0,05 mg/kg/dia.

Neste estudo avaliou-se a migração de bisfenol A em várias marcas de biberões de policarbonato sujeitos a diversas condições de utilização (temperatura, tempo de contacto e pH), foi realizada uma estimativa do risco de exposição ao bisfenol A a partir dos biberões de PC, numa população de crianças entre os 0-6 meses.

As condições dos ensaios de migração foram seleccionadas com base nas Normas Europeias 14350-2 e 13130-1 e foi realizado um ensaio com o objectivo de mimetizar as condições reais de utilização repetida.

As amostras recolhidas foram analisadas por HPLC com detector de fluorescência, tendo o método sido previamente validado.

Os resultados obtidos sugerem que o bisfenol A se liberta de todas as marcas de biberões estudadas, no entanto, em algumas marcas isso só acontece para condições de tempo e temperatura relativamente drásticas. Em todos os casos os biberões analisados encontram-se dentro dos limites especificados pela UE. Os índices de risco calculados para os vários ensaios são em todos os casos bastante inferiores a 1, pelo que se pode considerar um risco reduzido.

Por fim salienta-se que a informação do fabricante que acompanha o biberão é nalguns caso bastante incompleta. Assim, apesar dos baixos níveis de bisfenol

A detectados, é importante corrigir essas deficiências e alertar as mães para certos procedimentos que podem degradar mais facilmente o biberão.

**Palavras-chave** – bisfenol A, policarbonato, biberão, ensaios de migração

## ABSTRACT

Bisphenol A is a known estrogenic compound with effects on fertility, development and behaviour. Recent studies show that this compound is active even at doses below TDI levels.

Currently the main application of bisphenol A is polycarbonate manufacture. This polymer is approved for manufacturing containers that come into contact with foodstuffs such as baby feeding bottles.

The European Union (EU) defines a specific migration limit for bisphenol A of 3 mg/L. This limit will be reduced to 0,6 mg/L after December 2007. When dealing with recipients used in child care the limit is 0,3 mg/L. The EU recently established a TDI of 0,05 mg/kg/day.

This study evaluated bisphenol A migration from several polycarbonate baby feeding bottle brands when submitted to different time, temperature and pH conditions. It was calculated the risk index for bisphenol A exposition from PC baby feeding bottles in children from 0 – 6 months.

The migration studies have been selected from EN 14350-2; EN 13130-1 and another study has been performed to reproduce the real repeated use conditions. The samples were analyzed by HPLC with fluorescence detector after validation of the method.

The results suggest that bisphenol A is released from all brands analyzed although in some of them this only happens in drastic conditions of time and temperature. All baby feeding bottles analyzed are within the limits imposed by the EU.

All the risk index calculated for the several studies are all well below 1 which means that risk in this case is small.

Another important issue is the incomplete manufacturer information that comes with baby feeding bottles. Although the levels of bisphenol A detected were low it is important to eliminate these deficiencies and alert mothers to inadequate uses that may lead to baby feeding bottle degradation.

**Key Words** – bisphenol A, polycarbonate, baby feeding bottle, migration studies

## AGRADECIMENTOS

Gostava de deixar aqui o meu sincero agradecimento a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste projecto, em particular:

À Prof<sup>a</sup> Ana Paula Santos e à Prof<sup>a</sup> Maria Luísa Mateus por toda a orientação prestada ao longo do trabalho e sobretudo pelo apoio e incentivo que me deram.

À Prof<sup>a</sup> Camila Batoréu quero agradecer todas as sugestões e críticas que foi fazendo ao longo do trabalho.

À Prof<sup>a</sup> Matilde Castro pelo empenho que teve durante todo o mestrado e por todas as diligências que fez para que tudo corresse sempre pelo melhor.

Queria também agradecer à Dr<sup>a</sup> Isabel Joglar e à Dr<sup>a</sup> Virgínia Carvalho pelas sugestões dadas ao longo do trabalho e pela paciência que tiveram comigo.

Não queria deixar de expressar o meu agradecimento por toda a disponibilidade demonstrada pela D. Adelaide Serra, D. Verónica Silva e D. Isabel Correia.

À Dr<sup>a</sup> Ana Maria Gonçalves pois sem a sua compreensão não teria sido possível conciliar o mestrado com a minha actividade profissional.

Ao Nuno Teodoro e ao Nuno Miranda pela companhia e bons momentos que passámos no laboratório.

Ao Vítor Martins, à Rita Pimentel e à Isabel Ribeiro pelas agradáveis horas que passámos juntos.

E sobretudo ao Tiago.

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Estrutura química de vários compostos capazes de se ligar ao receptor dos estrogéneos	10
Figura 2 Estrutura química do bisfenol A	11
Figura 3 Síntese do polycarbonato a partir de bisfenol A	29
Figura 4 Biberões de polycarbonato	29
Figura 5 Distribuição percentual dos métodos de esterilização aplicados pelas mães inquiridas (n = 42)	46
Figura 6 Distribuição em frequência absoluta das respostas obtidas no questionário relativas ao tipo de alimento administrado no biberão (n = 42)	47
Figura 7 Distribuição percentual do tipo de biberão utilizado pelas mães inquiridas (n = 42)	48
Figura 8 Distribuição percentual das várias marcas de biberões utilizados pelas mães inquiridas (n = 42)	49
Figura 9 Distribuição percentual do número de utilizações diárias do biberão (n = 42)	50
Figura 10 Distribuição percentual dos processos de preparação de biberões referidos no questionário (n = 42)	51
Figura 11 Distribuição percentual dos tempos de contacto entre o alimento e o biberão referidos no questionário (n=42)	52
Figura 12 Distribuição percentual dos motivos referidos pelas mães inquiridas, para a inutilização do biberão (n = 42)	53
Figura 13 Exemplo de uma curva de calibração obtida para o bisfenol A. Cada ponto corresponde ao valor médio das áreas dos picos obtidos (n = 3)	58
Figura 14 Cromatograma de uma solução padrão de bisfenol A com concentração 0,1 ppb	60
Figura 15 Comparação da migração de bisfenol A durante 30 minutos a 100°C, em água desionizada e ácido acético 3%, para a marca B (n = 3)	75
Figura 16 Migração de bisfenol A ao longo de 25 ensaios para marca C. Cada ponto corresponde ao valor médio (n = 3)	77



## ÍNDICE DE TABELAS

	Página
Tabela 1    Gradiente de metanol e água utilizado como fase móvel para detecção do bisfenol A por HPLC	40
Tabela 2    Condições analíticas para quantificar o bisfenol A por HPLC, referidas na NE 14350	54
Tabela 3    Condições analíticas iniciais para quantificar o bisfenol A por HPLC	55
Tabela 4    Condições analíticas optimizadas para quantificar o bisfenol A por HPLC	56
Tabela 5    Cálculo da repetibilidade do método (n = 10)	62
Tabela 6    Cálculo da precisão intermédia do método (n = 10)	63
Tabela 7    Informação sobre as várias marcas de biberões adquiridos	64
Tabela 8    Concentração média de bisfenol A detectada, no simulador, no 3º ensaio do estudo preliminar	65
Tabela 9    Estudo da migração de bisfenol A a 40°C / 24 horas. Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão (n = 3)	67
Tabela 10   Seleção do tempo de contacto	68
Tabela 11   Seleção da temperatura de contacto	68
Tabela 12   Estudo da migração de bisfenol A a 100°C / 30 minutos. Os valores apresentados correspondem à média, desvio padrão e desvio padrão relativo (n = 6)	70
Tabela 13   Estudo da migração de bisfenol A a 100°C / 4 horas. Os valores apresentados correspondem à média, desvio padrão e desvio padrão relativo (n = 3)	72
Tabela 14   Variação dos resultados dentro da mesma marca em diferentes lotes. Os valores apresentados correspondem à média, desvio padrão e desvio padrão relativo (n = 8)	74
Tabela 15   Estudo da migração de bisfenol A a 100°C / 30 minutos em ácido acético 3% para a marca B. Os valores apresentados correspondem à média, desvio padrão e desvio padrão relativo (n = 3)	75

Tabela 16	Avaliação da exposição e estimativa do IR, considerando os valores de migração de bisfenol A do estudo a 100 °C / 30 minutos, para crianças entre 0 e 6 meses de idade	79
		Página
Tabela 17	Avaliação da exposição e estimativa do IR, considerando os valores de migração de bisfenol A do estudo a 100 °C / 4 horas, para crianças entre 0 e 6 meses de idade	80
Tabela 18	Avaliação da exposição e estimativa do IR, considerando os valores de migração de bisfenol A para o ensaio que pretende mimetizar as condições de utilização real do biberão, para crianças entre 0 e 6 meses de idade	81
Tabela 19	Avaliação da exposição ao bisfenol A proveniente de várias fontes, em crianças de 0 – 6 meses	82

## ABREVIATURAS E SIGLAS

AhR	Receptor de Hidrocarbonetos Aromáticos
APC	American Plastics Council
APME	Association of Plastic Manufacturers in Europe
AUC	Area under the curve - área sob a curva
BAGIG	Bisphenol A Global Industry Group
BFA	Bisfenol A
SCTEE	Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment
CVr	Coeficiente de Variação ( Desvio Padrão Relativo - DPR)
DDT	Dicloro-difenil-tricloroetano (Tricloro-bis-p-clorofenil-etano)
DE	Desreguladores Endócrinos
DES	Dietilestilbestrol
DP	Desvio Padrão
DPR	Desvio Padrão Relativo
E/E	Endocrine/Estrogen
EFSA	European Food Safety Authority
EPA	Environmental Protection Agency
ER	Receptor dos estrogéneos
ER $\alpha$	Receptor dos estrogéneos $\alpha$
ER $\beta$	Receptor dos estrogéneos $\beta$
ER $\gamma$	Receptor dos estrogéneos $\gamma$
EM	Espectroscopia de massa
EU	European Union
EURAR	European Union Risk Assessment Report
GLEMEDS	Great Lakes Embryo Mortality, Edema and Deformity Syndrome
h	Horas
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IARC	International Agency for Research on Cancer
LD	Limite de detecção

LOAEL	Lowest Observed Adverse Effect Level
LOEL	Lowest Observed Effect Level
Log Kow	Logaritmo do coeficiente de partilha óleo em água
LQ	Limite de quantificação
min	Minutos
MOS	Margin of safety
NE	Norma Europeia
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level
NOEL	No Observed Effect Level
NTP	National Toxicological Program
O/A	Óleo em água
OMS	Organização Mundial de Saúde
PC	Policarbonato
PCB's	Bifenilos policlorados
ppb	Partes por bilião ( $\mu\text{g/L}$ )
PVC	Cloreto de polivinilo
RfD	Reference Dose
SNC	Sistema Nervoso Central
T	Temperatura
T3	Tri-iodotironina
T4	Tiroxina
TDI	Tolerable Daily Intake
TNF $\alpha$	Factor de Necrose Tumoral $\alpha$
TR $\alpha$	Resceptor das hormonas da tiroide $\alpha$
TR $\beta$	Receptor das hormonas da tiroide $\beta$
t-TDI	Temporary Tolerable Daily Intake
UE	União Europeia
UGT	UDP Glucoronil transferase
UNEP	United Nations Environmental Program
UV-vis	Ultra-violeta / visível

WHO	World Health Organization
$\lambda$	Comprimento de onda

## ÍNDICE GERAL

RESUMO	IV
ABSTRACT	VI
AGRADECIMENTOS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
ÍNDICE DE TABELAS	IX
ABREVIATURAS E SIGLAS	XI
ÍNDICE GERAL	XIV

## **PARTE I - ENQUADRAMENTO E INTRODUÇÃO** 1

1. DESREGULADORES ENDÓCRINOS	2
1.1. Efeitos nas populações selvagens	2
1.2. Possíveis efeitos para o Homem	4
1.3. Mecanismos de acção dos DE	6
2. XENOSTROGÉNEOS	8
2.1. Mecanismos de acção dos xenostrogéneos	8
2.2. Classificação dos xenostrogéneos	8
3. BISFENOL A	11
3.1. Descoberta do bisfenol A	11
3.2. Propriedades físico-químicas do bisfenol A	12
3.3. Produção e aplicações do bisfenol A	12
3.4. Via de exposição ao bisfenol A	13
3.5. Biomonitorização do bisfenol A	15
3.6. Toxicocinética do bisfenol A	15
3.7. Efeitos Tóxicos do bisfenol A	17

• Estrogenicidade	17
• Toxicidade aguda	19
• Toxicidade após exposição repetida	19
• Mutagenicidade e carcinogenicidade	19
• Efeitos imunotóxicos	20
• Efeitos relacionados com stress oxidativo	21
• Efeitos no desenvolvimento	21
• Efeitos na fertilidade	23
• Efeitos no comportamento	24
3.8 Polémica em torno dos efeitos do bisfenol A em doses baixas	26
4. PLÁSTICO POLICARBONATO	29
4.1. Características do plástico polycarbonato	29
4.2. Migração de bisfenol A	30
4.2.1. Determinação da migração específica de bisfenol A a partir de recipientes de polycarbonato	31
5. LEGISLAÇÃO	33
6. OBJECTIVOS DO ESTUDO	35
<b>PARTE II - MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>37</b>
1. QUESTIONÁRIO	38
2. ANÁLISE DO BISFENOL A	38
2.1. Reagentes	38
2.2. Materiais e Equipamento	39
2.3. Condições para detecção do bisfenol A cromatografia líquida de alta eficiência	39

3.	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA OS ESTUDOS DE MIGRAÇÃO	40
3.1.	Estudo preliminar	40
3.2.	Estudo de migração a 40 °C durante 24 horas com água desionizada	41
3.3.	Estudo de migração a 100 °C durante 30 minutos com água desionizada	41
3.4.	Estudo de migração a 100 °C durante 4 horas com água desionizada	42
3.5.	Estudo intramarca	43
3.6.	Estudo de migração a 100 °C durante 30 minutos com ácido acético 3%	43
3.7.	Estudo mimetizando condições reais de utilização repetida	43
	<b>PARTE III - RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>44</b>
1.	QUESTIONÁRIO	45
1.1.	Resultados do questionário	46
1.1.1.	Lavagem e esterilização dos biberões	46
1.1.2.	Alimentos administrados com biberão	47
1.1.3.	Tipo de biberão	48
1.1.4.	Hábitos de utilização do biberão	49
1.1.5.	Inutilização do biberão	53
2.	DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO	54
2.1.	Linearidade	57
2.2.	Limite de detecção e limite de quantificação	59
2.2.1.	Limite de detecção	59
2.2.2.	Limite de quantificação	60
2.3.	Sensibilidade	61
2.4.	Precisão	61
2.4.1.	Repetibilidade	61



2.4.2.	Precisão intermédia	63
3.	ESTUDOS DE MIGRAÇÃO	64
3.1.	Estudo preliminar	64
3.2.	Estudo de migração a 40°C durante 24 horas com água desionizada	66
3.3.	Estudo de migração a 100°C durante 30 minutos com água desionizada	68
3.4.	Estudo de migração a 100°C durante 4 horas com água desionizada	71
3.5.	Ensaio intramarca	73
3.6.	Estudo de migração a 100°C durante 30 minutos com ácido acético 3%	74
3.7.	Ensaio mimetizando condições reais de utilização repetida	76
4.	AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO	79
	<b>PARTE IV – CONCLUSÕES</b>	83
	CONCLUSÕES FINAIS E SUGESTÕES	88
	<b>PARTE V – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	89
	<b>ANEXOS</b>	101